

Cómo evitar la introducción y dispersión de enfermedades en las plantaciones de cítricos

Programas de Saneamiento, Cuarentena y Certificación

M^a Carmen Vives.

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.

Actualmente, la citricultura española no tiene grandes problemas de enfermedades gracias al Programa de Mejora Sanitaria de Variedades de Cítricos que se estableció en 1975 y que ha permitido la renovación total de las plantaciones con material sano. Sin embargo, las perspectivas sanitarias en el futuro son preocupantes debido a graves enfermedades como Huanglongbing, clorosis variegada y cancrrosis, que están presentes en otros países y que suponen una seria amenaza para nuestra citricultura.

El estado sanitario de las plantaciones de cítricos es un aspecto fundamental para el desarrollo y mantenimiento de una citricultura competitiva ya que las enfermedades transmisibles por injerto que afectan al cultivo

pueden ser el principal factor limitante del mismo. El Programa de Mejora Sanitaria de Variedades de Cítricos incluye los Programas de Saneamiento, Cuarentena y Certificación y se estableció hace 42 años con el objetivo de obtener plantas libres de enfermedades y de garantizar la sanidad de las mismas a lo largo de todo el proceso de multiplicación. Los resultados de la investigación en el campo de la virología desarrollada en el IVIA durante los últimos años han permitido introducir mejoras en el programa que reducen los plazos del procedimiento y aumentan la garantía sanitaria del material que los viveros ponen a disposición de los agricultores.

Los cítricos pueden resultar afectados por numerosos agentes patógenos transmisibles por injerto, como hongos, bacterias, fitoplasmas, micoplasmas, virus y viroides que causan importantes pérdidas económicas en la mayoría de las zonas productoras (Duran-Vila y Moreno, 2000). En general las enfermedades transmisibles por injerto pueden afectar a:

- i) La producción, causando mermas tanto de cantidad como de calidad de la fruta.
- ii) El uso de ciertos patrones, que son especialmente sensibles a determinadas enfermedades.
- iii) El estado general de los árboles, causando decaimiento, pérdida de vigor, reducción de la vida comercial de los mis-

mos, e incluso pueden llegar a causar su muerte.

En muchas áreas cítricas estas enfermedades representan el principal factor limitante del cultivo. De hecho, la evolución de la citricultura en España también ha estado siempre condicionada por la aparición de diferentes enfermedades (gomosis en el siglo XIX, tristeza y otras virosis en el siglo XX) que han ido provocando sucesivas crisis y que se han superado gracias a profundos cambios estructurales del sistema de producción. Hay que tener en cuenta que no existen métodos curativos para las enfermedades transmisibles por injerto, por lo tanto cuando un árbol se infecta permane-



ce enfermo durante toda su vida y puede ser fuente de infección para otros árboles ya que las enfermedades se transmiten principalmente con el material de propagación. Además, algunas de estas enfermedades también se pueden transmitir mecánicamente mediante herramientas de corte o mediante insectos vectores, lo que dificulta enormemente su control. Por otro lado también



terial vegetal. Esta medida es suficiente para controlar las enfermedades que no se dispersan de forma natural. En el caso de las enfermedades que se dispersan de forma natural mediante insectos vectores, además de emplear plantas de vivero sanas, es necesario adoptar medidas adicionales de control, como la utilización de genotipos resistentes o tolerantes, el control de los vectores o la inoculación de los árboles con aislados suaves del patógeno para evitar la infección con aislados severos del mismo (protección cruzada). Todas estas medidas adicionales suponen un coste elevadísimo y largos programas de investigación para poder desarrollarlas.

Actualmente, la citricultura española no tiene grandes problemas de enfermedades gracias al Programa de Mejora Sanitaria de Variedades de Cítricos que se estableció en 1975 y que ha permitido la renovación total de las plantaciones con material sano (Navarro *et al.*, 2005). Sin embargo, las perspectivas sanitarias en el futuro son preocupantes debido a graves enfermedades como Huanglongbing, clorosis variegada y cancrrosis, que están presentes en otros países y que suponen una seria amenaza para nuestra citricultura. Además, el pequeño

pero existente tráfico incontrolado de material vegetal ilegal, la frecuente práctica del sobreinjerto con la finalidad de tener variedades con mayor precio en el mercado y la dificultad de diagnosticar las enfermedades en campo, suponen un peligro para las plantaciones sanas existentes. Para evitar la introducción y dispersión de nuevas enfermedades que podrían causar daños catastróficos es imprescindible mantener e incluso aumentar el nivel de protección actual, por tanto es necesario mejorar constantemente la tecnología empleada en el Programa de Mejora Sanitaria de Variedades de Cítricos.

El Programa de Mejora Sanitaria de Variedades de Cítricos

Este programa integra los Programas de Saneamiento y Cuarentena, necesarios para la obtención de plantas sanas mediante la técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro* (Navarro y Juárez, 2005) y el Programa de Certificación, necesario para garantizar la sanidad de las plantas a lo largo de todo el proceso de multiplicación comercial (Pina *et al.*, 2015) (figura 1). Aunque cada programa es competencia de una institución pública diferente, la estrecha colaboración que se ha establecido entre ellas y la

hay que tener en cuenta que el periodo de latencia de las distintas enfermedades en campo desde que se infecta un árbol hasta que manifiestan los síntomas puede ser muy largo, incluso decenas de años, y los síntomas también pueden estar enmascarados por la tolerancia que pueda conferirles el patrón sobre el que están injertados, con lo que la infección puede pasar desapercibida y se puede estar transmitiendo la enfermedad sin ser consciente de ello.

El sistema más eficaz para el control de las enfermedades transmisibles por injerto consiste en la producción de plantas de vivero sanas mediante programas de Saneamiento, Cuarentena y Certificación del ma-

FIG 1. Esquema del Programa de Mejora Sanitaria de Variedades de Cítricos que incluye los Programas de Saneamiento, Cuarentena y Certificación.

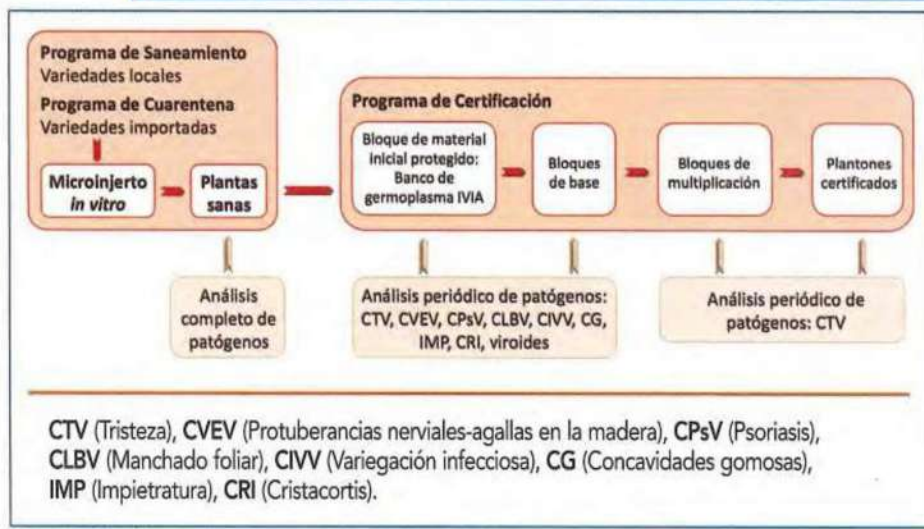
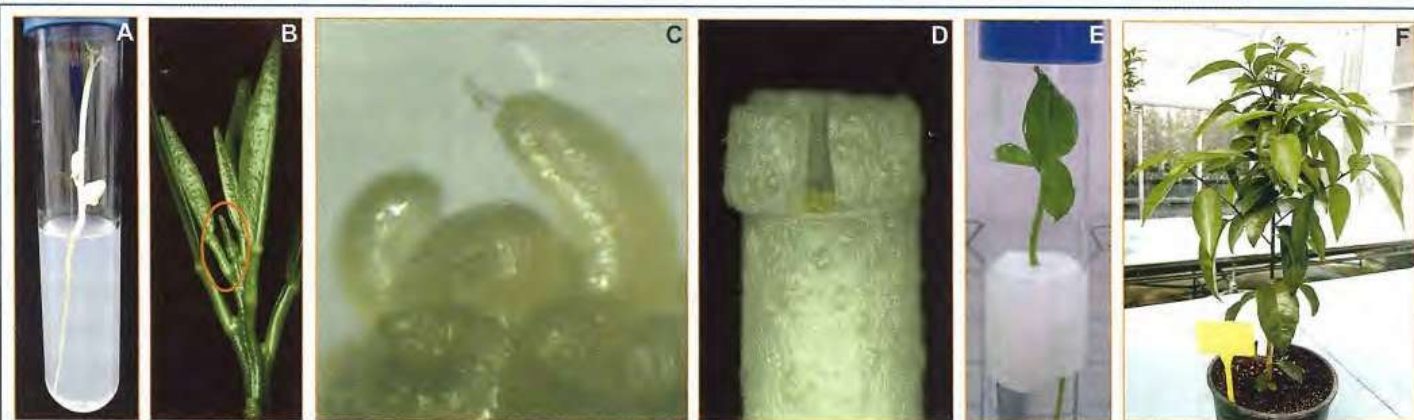


FIG 2. Procedimiento de microinjerto de ápices caulinares *in vitro*.



A) Plántula de citrange Troyer usada como patrón, obtenida a partir de una semilla germinada *in vitro*. **B)** Brote de la variedad a sanear. **C)** Detalle del fragmento del brote usado para microinjertar formado por el meristemo apical y tres primordios foliares. **D)** Detalle de un microinjerto recién hecho mostrando el fragmento injertado en el interior de la incisión del patrón. **E)** Plántula de mandarino sobre citrange Troyer seis semanas después del microinjerto. **F)** Planta saneada de mandarino sobre *C. macrophylla* al año de la realización del microinjerto.

gran implicación de los viveros han permitido el exitoso desarrollo de los mismos. El Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (Mapama) es el que establece la normativa que regula las actividades incluidas en los distintos Programas. Los servicios de Sanidad Vegetal de las distintas comunidades autónomas controlan la ejecución de la normativa establecida por el Mapama y en el IVIA es donde se coordina y realiza la mayoría de las actividades técnicas del programa. El hecho de que es-

tas actividades se coordinen en un centro de investigación permite la aplicación inmediata en el mismo de los avances científicos generados en el campo de la eliminación de enfermedades y el diagnóstico de patógenos de cítricos.

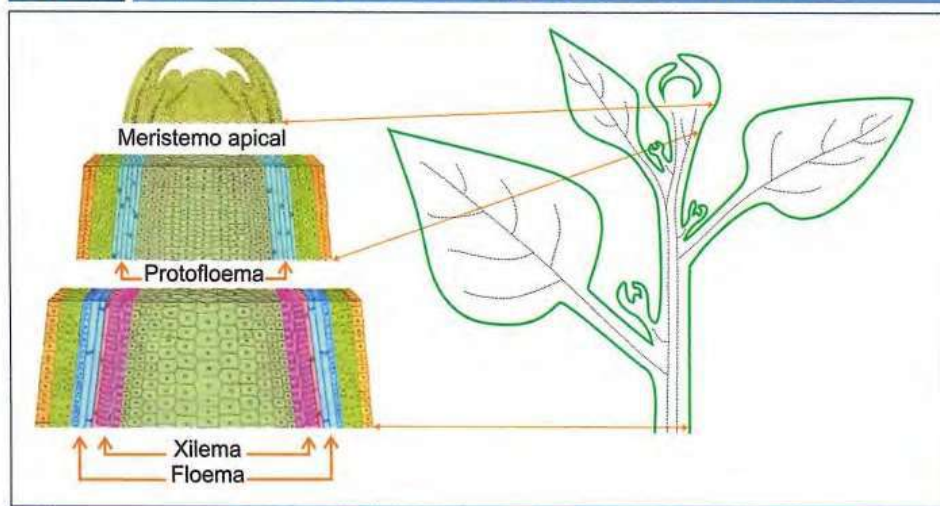
Programas de Saneamiento y Cuarentena

El objetivo de estos programas es la obtención de plantas sanas de genotipos seleccionados en España (Programa de Sa-

neamiento) o en otros países (Programa de Cuarentena). La introducción de material vegetal de cítricos (excepto frutos y semillas) procedentes de terceros países está prohibida en toda la Unión Europea (Real Decreto 58/2005) y sólo se puede hacer con fines de ensayo o científicos o para la selección de variedades a través de una Estación de Cuarentena (Real Decreto 401/1996). Por otro lado, para poder inscribir una variedad en el registro de variedades comerciales y/o protegidas ésta también debe cumplir las condiciones fitosanitarias establecidas en el Real Decreto 58/2005 mencionado anteriormente y para poder propagarla comercialmente necesita cumplir las condiciones fitosanitarias establecidas en el Real Decreto 929/1995, que contempla el Reglamento técnico de control y certificación de plantas de vivero de frutales. Por lo tanto, todas las plantas de las variedades que se comercializan deben estar sanas.

El procedimiento de saneamiento aplicado en ambos programas es el mismo e incluye la eliminación de patógenos mediante la técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro* y el diagnóstico de patógenos de las plantas microinjertadas me-

FIG 3. Esquema de la organización del tejido vascular de un brote.



diente métodos biológicos y análisis moleculares para garantizar la ausencia de los mismos.

La técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro* consiste en injertar un fragmento formado por el meristemo apical y dos o tres primordios foliares de un brote de la planta que se quiere sanear, en un patrón germinado en condiciones estériles (figura 2). Esta técnica se basa en el hecho de que, aunque la planta esté enferma, los patógenos suelen estar localizados en el tejido vascular (xilema o floema) de la misma y no pueden acceder a la región meristemática de los ápices caulinares porque el tejido de esa zona todavía no está diferenciado y no tiene conexiones vasculares con el resto de la planta (figura 3), por lo tanto esta región normalmente está libre de patógenos y se puede regenerar

una planta sana a partir de ella sin alterar las características de la variedad.

Una vez que se obtiene la planta sanada, ésta se somete a un análisis completo de patógenos para confirmar la ausencia de los mismos (cuadro I). Siempre que es posible se utilizan dos métodos de diagnóstico diferentes para analizar cada uno de los patógenos con el fin de aumentar la garantía de los resultados. Al principio del programa sólo se disponía de métodos biológicos de diagnóstico pero, gracias a la investigación realizada tanto en el IVIA como en otros centros de investigación, hemos desarrollado e incorporado todos los métodos moleculares de detección indicados en el cuadro I.

Los métodos biológicos de diagnóstico consisten en inocular mediante injerto de fragmentos de corteza de la planta a analizar,

especies o variedades de cítricos que son especialmente sensibles a determinadas enfermedades. Una vez inoculadas, las plantas indicadoras se cultivan en el invernadero a la temperatura adecuada y se observa la aparición de síntomas de enfermedades durante tres brotaciones (figura 4). Los métodos biológicos son sensibles y fiables pero son muy largos, costosos y en ocasiones inespecíficos ya que diferentes patógenos pueden inducir los mismos síntomas. Por su parte, los métodos moleculares consisten en la detección de proteínas (métodos serológicos (Elisa) o ácidos nucleicos (hibridación molecular, PCR convencional y cuantitativa, electroforesis en geles de poliacrilamida) específicos de cada patógeno (figura 5).

Los métodos moleculares son muy sensibles, más rápidos, más baratos y son es-

Nuevas
ideas como
respuesta a
los retos
actuales.



Kubota

M5001N: El primero de su clase

El principal objetivo del M5001 N es hacerle la vida más fácil, ahorrándole tiempo y dinero.



www.kubota.es

www.construye.kubota.es



For Earth, For Life
Kubota

*Consulte el coste, términos y condiciones de esta garantía adicional sin franquicia en su concesionario Kubota. ¡Se sorprenderá!

CUADRO I.

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE PATÓGENOS EMPLEADOS EN LOS PROGRAMAS DE SANEAMIENTO, CUARENTENA Y CERTIFICACIÓN DE CÍTRICOS.

MÉTODOS BIOLÓGICOS		
Planta indicadora	Tª de incubación	Enfermedades detectadas
Lima Mejicana ^S	18-25°C	Tristeza, Protuberancias nerviales-agallas en la madera, Hoja rugosa, Escobas de bruja
Naranja Pineapple ^{S,C}	18-25°C	Psoriasis, Manchas anulares, Concavidades gomosas, Cristacortis, Impiaturatura, Huanglongbing
Tanger Dweet ^{S,C}	18-25°C	Psoriasis, Manchas anulares, Concavidades gomosas, Cristacortis, Impiaturatura, Mosaico, Manchado foliar
Citrus excelsa ^S	18-25°C	Hoja rasgada-enanismo del citrange, Tristeza
Cidro etrog ^S	18-25°C	Variegación infecciosa, Tristeza, Enanismo del mandarino satsuma
Cidro etrog ^{S,C}	27-32°C	Exocortis, Caquexia y otros viroides
MÉTODOS MOLECULARES		
Método	Patógenos detectados	
sPAGE ^S	CEVd (Exocortis), HSVd (Caquexia) y otros viroides (CBLVd, CDVd, CBCVd, Cvd-V y Cvd-OS)	
Hibridación de sondas ^{S,C}	HSVd (Caquexia)	
RT-PCR, S-C*	CTV (Tristeza)*, CPsV (Psoriasis), CLBV (Manchado foliar)*, CVEL (Protuberancias nerviales-agallas en la madera)*, CILV (Hoja rasgada-enanismo del citrange), CILV (Leprosis), SDV (Enanismo del mandarino satsuma), CSDaV (Muerte súbita), CIVV/CLRV (Variegación infecciosa/hoja rugosa)*, Cristacortis, Impiaturatura, Concavidades gomosas, Incompatibilidad del kumquat sobre patrones trifoliados	
PCR ^S	CYMV (Mosaico), <i>Spiroplasma citri</i> (Stubborn), <i>Phytoplasma aurantifolia</i> (Escobas de bruja), <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> , <i>africanus</i> y <i>americanus</i> (Huanglongbing), <i>Xylella fastidiosa</i> (Clorosis variegada), <i>Xanthomonas citri</i> (Cancrosis), <i>Pseudomonas tracheiphila</i> (Mal seco)	
Inmunoimpresión-ELISA ^C	CTV (Tristeza)	

^S Métodos empleados para el análisis completo efectuado en los Programas de Saneamiento y Cuarentena.

^C Métodos empleados para los análisis periódicos efectuados en el Programa de Certificación.

pecíficos del patógeno que se analiza. La incorporación de los métodos moleculares de diagnóstico en los Programas de Saneamiento y Cuarentena nos ha permitido disminuir los plazos del procedimiento y aumentar la garantía del mismo.

Programa de Certificación

El objetivo principal de este programa es garantizar que el estado sanitario de las variedades obtenidas en los Programas de Saneamiento y Cuarentena se mantenga durante el proceso de propagación comercial en los viveros de cítricos. La multiplicación comercial de cítricos está organizada en cuatro bloques de árboles (figuras 1 y 6):

1) El bloque inicial protegido forma parte del Banco de Germoplasma del IVIA e incluye un ejemplar de cada uno de los 679 genotipos saneados en los programas anteriores y mantenidos en recintos de malla anti-insectos.

2) Los bloques de base están formados

por aproximadamente 1.800 árboles propagados únicamente a partir del material del bloque inicial protegido. Normalmente se mantienen tres o cuatro árboles de cada variedad en recintos de malla anti-insectos y pertenecen a siete viveros de base. Los viveros de base pueden ser agrupaciones de viveros o viveros individuales.

3) Los bloques de multiplicación de yemas están formados por unos 250.000 árboles propagados directamente de los árboles de base. Estos árboles pertenecen a cuarenta viveros, se mantienen en recintos de malla o invernaderos y se tienen que renovar cada cinco años para evitar la propagación de posibles mutaciones.

4) Los bloques de planta certificada se propagan únicamente con yemas de los bloques de multiplicación injertadas sobre patrones provenientes de árboles certificados productores de semillas. Actualmente los viveros de cítricos están produciendo unos 3,5 millones de plantas al año y lo hacen en recintos de malla, en invernaderos o en campo abierto.

Las plantas de cada bloque se analizan periódicamente a las diferentes enfermedades incluidas en el Reglamento de Certificación utilizando los métodos indicados en el cuadro I. Al inicio del programa todos los patógenos se diagnosticaban mediante métodos biológicos pero actualmente se han introducido métodos moleculares, lo que nos ha permitido abaratar los costes y disminuir el tiempo de análisis. Todas las plantas del bloque inicial y de los bloques de base se analizan en el IVIA cada tres años a enfermedades que se transmi-

FIG 4. Diagnóstico biológico de patógenos de cítricos.



(Continúa en pág. 40)

ten mediante insectos vectores (tristeza y protuberancias nerviales-agallas en la madera), cada seis años a enfermedades que se transmiten mecánicamente (exocortis, caquexia y otros viroides) y cada diez años a enfermedades que sólo se transmiten mediante injerto (psoriasis, manchas anulares, cristacortis, impietratura, concavidades gomosas, variegación infecciosa y manchado foliar). Por otro lado, todas las plantas de los bloques de multiplicación y el 0,1% de las plantas certificadas se analizan anualmente a tristeza mediante inmunopresión-Elisa en los laboratorios de Sanidad Vegetal de las distintas comunidades autónomas.

FIG 5. Métodos de diagnóstico molecular de patógenos de cítricos.

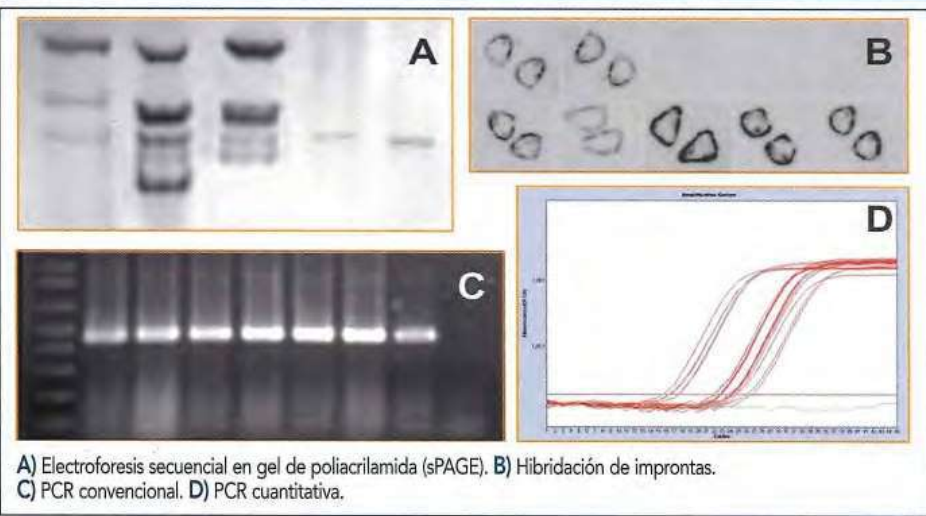


FIG 6. Bloques de multiplicación de cítricos.



Además de los controles sanitarios, el programa de Certificación controla la autenticidad varietal del material propagado, la calidad agronómica de las plantas y el sistema de etiquetado de las mismas. Por otro lado, también incluye controles administrativos y regula aspectos relacionados con la comercialización y autorización de la actividad viverística.

Conclusiones

La mejor forma de luchar contra las enfermedades y la más barata siempre es la prevención. El Programa de Mejora Sanitaria de Variedades de Cítricos de España ha demostrado ser altamente efectivo para evitar la introducción y dispersión de nuevas enfermedades, sin embargo actual-

mente hay un serio peligro de introducción de enfermedades muy graves para la citricultura como son HLB, clorosis variegada y cancrisis, por tanto es necesario mantener e incluso aumentar las medidas de protección para un adecuado control sanitario del material vegetal propagativo. Sería necesario hacer una normativa más restrictiva y adecuada para el movimiento y propagación del material vegetal, los viveros tendrían que hacer toda la producción en recintos protegidos, se deberían desarrollar más proyectos de investigación relacionados con estas enfermedades y se debería evitar la introducción y multiplicación de material ilegal ya que constituye el mayor peligro para la propagación de enfermedades. Tenemos las herramientas adecua-

das para evitar que lleguen pero es necesaria la implicación de todo el sector, desde la administración hasta los agricultores, para mantener una citricultura de alta calidad. ■

BIBLIOGRAFÍA

- Duran-Vila, N., Moreno, P. 2000. Enfermedades de los cítricos. Monografía de la Sociedad Española de Fitopatología N° 2. Ediciones Mundi-Prensa Madrid, España. 165 pp.
- Navarro, L., Juárez, J. 2005. Microinjerto de ápices caulinares de cítricos in vitro. *Phytoma* 170, 6-13.
- Navarro, L., Pina, J.A., Juárez, J., Arregui, J.M., Ortega, C., Navarro, A., Ballester-Olmos, J.F., Vives, M.C., Montalt, R., Durán-Vila, N., Guerrí, J., Moreno, P., Cambra, M., Medina, A., Zaragoza, S. 2005. El Programa de Mejora Sanitaria de Variedades de Cítricos en España: 30 años de historia. *Phytoma* 170, 14-23.
- Pina, J.A., Chomé, P., Vives, M.C., Navarro, L., 2015. The citrus nursery tree certification program in Spain. *Acta Horticulturae* 1065, 745-753.